Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 37, No. 2, Summer 2023, p. 409-421

The Effect of Chalcone Isomerase Gene Silencing on Pigment Production Pathway in *Petunia hybrida* with RNAi Technology

F. Keykha Akhar[1]*, A.R. Bagheri[2], N. Moshtaghi[3], M. Fakhrfeshani[4]

Received: 12-04-2022
Revised: 03-08-2022
Accepted: 26-09-2022
Available Online: 26-09-2022

How to cite this article:
Keykha Akhar, F., Bagheri, A.R., Moshtaghi, N., & Fakhrfeshani, M. (2023). The effect of chalcone isomerase gene silencing on pigment production pathway in Petunia hybrida with RNAi technology. *Journal of Horticultural Science*, *37*(2), 409-421. (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/jhs.2022.76190.1162

Introduction

Flower color is one of the most significant characteristics in ornamental plant breeding. New varieties of various plants in relation to their flower color have been obtained by monitoring the expression levels of genes involved or regulating the flavonoid and anthocyanin biosynthesis pathway. Flavonoids possess significant and diverse biological functions. They are the major pigments for flowers, fruits, seeds, and leaves. They are natural products that contain a C6-C3-C6 carbon framework and are synthesized by a branched pathway that yields both colored and colorless compounds. The gene encoding chalcone isomerase (CHI) is among the genes and enzymes identified in the flavonoid pathway. This enzyme catalyzes the isomerization of naringenin chalcone into the corresponding flavanone. CHI enzyme belongs to the family of isomerases, specifically the class of intramolecular lyases. Chalcone isomerase has a core 2-layer alpha/beta structure and has attracted much attention recently due to its role in stress response and pigment production. One of the most effective methods of genetic engineering is the reduction of flower pigments by suppression of required enzymes for their biosynthesis. RNA interference (RNAi) has provided the tool for the investigation of genes involved in the production of flower color. Silencing of any gene in the anthocyanin biosynthetic pathway can result in reduced or inhibited anthocyanin production. RNAi technology is an effective gene silencing method and a powerful tool for studying gene function and development of new traits by transformation of viral RNA or hairpin RNA (hpRNA) constructs into plants. The processing of dsRNA into 21-23-nt small interfering RNAs (siRNAs), and the mediators of RNAi, triggers cognate mRNA degradation. The hpRNAi methodology simply requires a transgene construct containing an inversely-repeated sequence of the target gene flanked with a promoter and terminator which effectively function in plants.

Material and Methods

In this research, with the design and construction of chiRNAi, the transformation of the RNAi construct was carried out of Petunia plants. Potted plants of P. hybrida were grown under standard greenhouse conditions (16-17°C night temperature and 21-24°C day temperature and photoperiod 16/8 (light/dark)). The RNAi construct including the 530 bp cds of the chalcone isomerase (*chi*) gene and 741 bp of *pdk* gene as intron between chi sense and antisense were used for transient RNAi-induced silencing. The pBI121-chi530 plasmids were introduced into *A. tumefaciens* strain LBA4404 by electroporation method. Colonies of *A. tumefaciens* carrying the desired plasmid were screened by PCR with specific primers for *chi* gene. RNAi construct co-cultured with petunia's leave. Samples was kept in dark condition for 3 days and then transferred to branch induction media. Samples were investigated for phenotypical changes and chi gene expression by qRT-PCR.

1 and 4- Assistant Professors, Departement of Plant Genetic and Production, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
(*- Corresponding Author Email: F.Keykha@jahromu.ac.ir)
2 and 3- Professor and Associate Professor, Departement of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
DOI: 10.22067/jhs.2022.76190.1162

Results and Discussion

Transgenic lines showed a reduced number of pigments and a faded flower color. So that, in purple petunia, was shown 5 phenotypical groups. These groups was indicated different levels of *chi* gene silencing. In pink petunia was seen two groups of phenotypical changes. In these plants, *chi*-RNAi construct was reduced pigment production and so, these plants had faded colors in petals. Also, the *chi* gene expression was reduced in all transgenic lines. Generally, the results of this research showed that RNAi can be used as an efficient method for gene silencing. The application of gene silencing can indicate the gene's function in biosynthesis pathways of various components such as anthocyanins. In addition, the chalcone isomerase gene was identified as one of the effective genes in anthocyanin biosynthesis pathway in Petunia plants that could be involved in the production of color in these plants; hence, chi gene silencing resulted in clear phenotypic alterations in this plant.

Conclusion

In general the concentration of the target mRNA in a particular tissue could be a factor that influences silencing efficiency. At very low levels of gene expression, small amounts of the silencing target, mRNA, could be completely degraded by the RNA-induced silencing complex (RISC), whereas the presence of higher amounts of the target mRNA may result in incomplete silencing, allowing some residual functional mRNA to be translated into the corresponding protein. This research demonstrated the hpRNA construct has been successfully established for floral tissues of P. hybrida. The hpRNA construct was developed for chi-RNAi silencing of one of the key genes in the anthocyanin biosynthetic pathway in Petunia flowers. The silencing of the chi gene is a prototype for the modification of the anthocyanin biosynthetic pathway in Petunia through gene suppression. This strategy could also be useful for rapid functional analysis of other genes involved in flower development.

Keywords: Anthocyanin, Chalcone isomerase, Gene silencing, *Petunia hybrida*, RNAi

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۷، شماره ۲، تابستان ۱٤۰۲، ص. ٤۲۱-٤۰۹

اثر خاموشی ژن چالکون ایزومراز بر مسیر تولید رنگ در گیاه اطلسی با استفاده از فناوری RNAi

فاطمه کیخا آخر[1*]- عبدالرضا باقری[2]- نسرین مشتاقی[3]- مسعود فخرفشانی[4]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۳
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۵/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۴

چکیده

رنگ گل یکی از مهمترین خصوصیات گیاهان زینتی است که نقش ویژه ای را در فروش این نوع گیاهان ایفا می‌کند. در سال‌های اخیر با استفاده از فناوری‌های نوین از قبیل مهندسی ژنتیک ارقام جدیدی وارد بازار شده است که یکی از موثرترین روش‌های آن، کاهش مقدار رنگدانه‌های داخلی گل بوسیله ممانعت از فعالیت آنزیم‌های ضروری مورد نیاز برای بیوسنتز آن‌ها می‌باشد. روش RNAi یک فناوری نوین خاموشی ژن است که امکان بررسی ژن‌های دخیل در تولید رنگ گل را فراهم کرده است. در این پژوهش، با استفاده از این فناوری نوین، نقش ژن چالکون ایزومراز (*chi*) به عنوان یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش سازه RNAi ژن *chi* طراحی شد و به اطلسی‌های با رنگ گل بنفش و صورتی انتقال یافت. لاین‌های تراریخته، تغییرات متنوعی را در رنگ گل نشان دادند و به گروه‌های فنوتیپی متفاوتی تقسیم شدند. این تغییرات بیشتر به صورت کاهش مقدار تجمع رنگدانه‌ها و کمرنگ شدن گل‌ها بود. با بررسی بیان ژن chi، کاهش معنی‌دار بیان این ژن نیز مشاهده شد. بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که خاموشی ژن با استفاده از فناوری RNAi می‌تواند روش مناسبی برای کاهش بیان ژن باشد به طوری که با استفاده از این روش می‌توان به نقش ژن‌های مختلف در مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات از جمله آنتوسیانین‌ها پی برد. علاوه بر این، ژن چالکون ایزومراز به عنوان یکی از ژن‌های موثر در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها در گیاه اطلسی شناخته شد که می‌تواند در تولید رنگ در این گیاه نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، اطلسی، چالکون ایزومراز، خاموشی ژن، RNAi

مقدمه

در سال‌های اخیر، صنعت تولید گیاهان زینتی گسترش زیادی یافته است که یکی از دلایل آن، تولید و اصلاح ارقام جدید می‌باشد (Nishihara and Nakatsuka, 2010؛ Chandler and Sanchez, 2012). یکی از الزامات مورد نیاز برای تداوم این صنعت و گسترش آن، ایجاد تنوع در این نوع گیاهان است تا قادر باشد نیاز بازار را تامین نماید (Ahloowalia and Maluszynski, 2001).

مهندسی ژنتیک از طریق دستورزی مسیرهای متابولیکی توانسته است نقش قابل توجهی را در صنعت گل و گیاهان زینتی ایفا نماید بطوریکه با استفاده از روش¬های خاموشی و یا بیش بیان ژن‌های مرتبط، به تولید ارقام جدیدی از رز (*Rosa* sp.) گل سپاسی (*Gentian* sp.) میخک (*Dianthus* sp.) تورنیا (*Torenia fournieri*) با رنگ متفاوت، اطلسی (*Petunia hybrida*) میخک (*Dianthus* sp.) با رایحه و ماندگاری بیشتر و ... کمک شایان توجهی داشته است (Dixone, 2005؛ Voorhuijzen *et al*., 2020).

رنگ گل یکی از مهمترین صفاتی است که در روش‌های اصلاحی گیاهان زینتی به آن توجه ویژه‌ای شده است (Wang, 2006؛ To and Nishihara and Nakatsuka, 2011). مهم‌ترین عامل تعیین کننده رنگ گل، اجزای سازنده رنگدانه‌ها می‌باشند (Tanaka and Chandler, 2009؛ Keykha *et al*., 2016a). فلاونوئیدها یکی از مهمترین مسیرهای بیوسنتزی رنگ در گیاهان

۱ و ۴- استادیاران گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم
(*- نویسنده مسئول: Email: f.keykha@jahromu.ac.ir)
۲ و ۳- به‌ترتیب استاد و دانشیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

DOI: 10.22067/jhs.2022.76190.1162

مختلف می‌باشند. بگونه ای که بسیاری از روش‌های اصلاحی به ویژه مهندسی ژنتیک بـه شناسـایی ژن‌هـای دخیـل در مسـیر بیوسـنتزی فلاونوئیدها و نقش کارکردی هر یک از آنها در تولیـد رنـگ پرداختـه است. ماحصل چنین دستورزی‌هایی تولیـد ارقـام جدیـدی از گیاهـان می‌باشد. برای مثال در گیاهانی از قبیل اطلسـی، رز، میخـک و ژربـرا نمونه‌های دستورزی شده‌ای شناسـایی شـده اسـت (Potera, 2007؛ Voorhuijzen *et al*., 2020) کـه تغییراتـی را در مقـدار محتـوای آنتوسیانین (گروهی از فلاونوئیدها که ترکیبـات قرمـز، بـنفش و آبـی تولید می کنند) و کاروتنوئید (گروهی از ایزوپرنوئیـدها کـه رنـگ زرد، نارنجی و قرمز تولیـد مـی کننـد) نشـان مـی‌دهنـد (Potera, 2007؛ Voorhuijzen *et al*., 2020).

فلاونوئیدها ترکیبات دارای اسکلت ۱۵ کربنی بـوده و محلـول در آب می‌باشند که در واکوئل‌ها تجمع می‌یابند (Delgado-Vargas *et al*., 2000؛ Tanaka and Ohmiya, 2008). ساده‌ترین راهکار برای تغییر رنگ گـل، کـاهش مقـدار رنگدانـه‌هـای داخلـی گـل از جملـه فلاونوئیدها است که از بیوسنتز آنزیم‌های ضروری ممانعت کـرده و از این طریق مـی‌تـوان بـه نقـش آن ژن در تولیـد رنـگ دسـت یافـت (Nishihara and Nakatsuka, 2011؛ Wang *et al*., 2018).

RNAi یک فناوری قدرتمند است کـه بـا اسـتفاده از چنـد مولکـول RNA دو رشته‌ای کوچـک (dsRNA) سـبب خاموشـی بیـان ژن در سلول می‌شود و به عنوان روشی آسان و سریع بـرای تعیـین عملکـرد ژن در نظر گرفته شده اسـت (Thakur, 2003؛ Kim and Rossi, 2008).

در بـین گیاهـان زینتـی، اطلسـی (*Petunia hybrida*) یکـی از محبوب‌ترین گیاهان گلدانی است که پتانسیل خوبی را برای صـادرات به عنوان یک گیاه گلدانی و یا گیاه زینتی مورد استفاده در فضای سبز شهری در بسیاری از کشـورها دارا مـی‌باشـد (Tsuda *et al*., 2004؛ Chen *et al*., 2017). از آنجایی که این گیاه بـه عنـوان گیـاه مـدل استفاده می شود، توجه بسیاری بر روی این گیاه و شناسایی ژن‌هـای موثر در مسیرهای متابولیکی مختلف شده است. خصوصیات ظـاهری این گیاه از جمله شکل زیبا، گل‌هایی با رنگ جذاب و همچنین مـدت زمان طولانی گلدهی، موقعیت ویژه‌ای را برای آن فراهم کرده اسـت، بطوری‌که در لیست گیاهان گلدانی برتر جهان قـرار دارد (Park and Chen, 2006؛ Keykha *et al*., 2016b).

لذا با توجه به مطالب ذکر شده از جملـه قابلیـت روش RNAi در تعیین عملکرد یـک ژن از طریـق کـاهش بیـان آن و اهمیـت آنـزیم چالکون ایزومراز در مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها، این تحقیق با هـدف بررسی نقش ژن *chi* در تولید رنگدانه در گیاهان اطلسی بنفش رنـگ و صورتی با استفاده از تکنیک RNAi انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

بذرگیاهان اطلسی هلندی از شرکت بذر شکوفه اصفهان خریداری شده و در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه بـا شـرایط دمـایی ۱۶-۱۷ درجه سانتی‌گراد دمای شب و ۲۴-۲۱ درجه سانتی‌گـراد دمـای روز و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تـاریکی رشـد یافتنـد. گیاهـان در مرحله ۸-۶ برگی در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

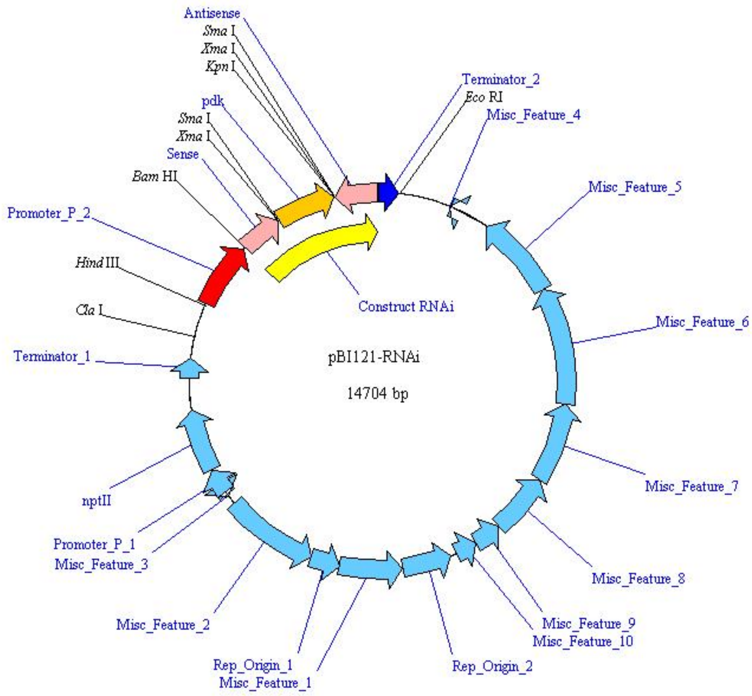
طراحی سازه خاموشی حاوی ژن *chi*

سـازه RNAi حـاوی قطعـه ۵۳۰ جفـت بـاز ناحیـه cds تـوالی mRNA ژن چـالکون ایزومـراز (*chi*) گیـاه اطلسـی (نوکلئوتیـدهای ۱۴۳۰-۱۹۶۰ با شماره دسترسیX14589) و قطعه ۷۴۱ جفـت بـاز از ژن پیروات دهیدروژناز کیناز (*pdk*) به عنوان اینترون (که بـین ناحیـه سنس و آنتی سنس ژن *chi* قرار گرفته است)، طراحی و سپس سـازه طراحی شده در وکتور pBI121 کلون گردیـد (شـرکت بـایونیر، کـره جنوبی) (شکل ۱).

به منظور استفاده از سازه خاموشی طراحی شده بـرای انتقـال بـه گیاه، در مرحله نخست نیاز به تکثیر پلاسمید حاوی توالی ژنـی سـنتز شده از طریق ترازیزش آن به باکتری *A. tumefaciens* است. با این هـدف پلاسـمیدهای pBI121 حـاوی ژن *chi* بـا اسـتفاده از روش الکتروپوریشن به باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل شدند (Lin, 1995). کلنی‌هایی از باکتری کـه حـاوی پلاسـمیدهای مورد نظر بودند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *chi* و با برنامه PCR شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقـه، دمـای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲ درجـه سـانتی‌گـراد بـه مدت ۱ دقیقه با ۳۵ سیکل تکثیر و جداسازی شدند. طراحی آغازگرهـا به گونه‌ای انجام شد که یک جفت آغازگر ناحیه پیشبر 35S و بخشی از قطعه سنس ژن *chi* را تکثیـر مـی‌کنـد (sense primer) و جفـت آغازگر دوم، بخشی از قطعـه آنتـی‌سـنس ژن *chi* و ناحیـه ترمینـاتور پلاسـمید pBI121 را تکثیـر مـی‌کنـد (antisense primer). تـوالی آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

انتقال سازه خاموشی حاوی ژن *chi* به گیاه اطلسی

جهت تراریختی گیاه اطلسی از روش دیسک برگی و هم‌کشتی با اگروباکتریوم استفاده شد. پس از کشت باکتری و هنگامی که OD_{600} باکتری به ۰/۵-۰/۴ رسید، سوسپانسیون باکتری به مـدت ۱۰ دقیقـه در ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد (دمـای ۴ درجـه سـانتی‌گـراد). مایع رویی حذف شده و به پلت باکتریایی موجود در انتهـای فـالکون، ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تلقیح اضافه شـد (محـیط کشـت تلقـیح شـامل محـیط کشـت MS مـایع حـاوی ۵ درصـد سـاکارز و ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون).



شکل ۱- سازه طراحی شده RNAi ژن *chi* همراه با آنزیم‌های برشی تعبیه شده در آن در وکتور pBI121

این سازه حاوی ۵۳۰ جفت باز از قطعه سنس و آنتی سنس توالی mRNA ژن چالکون ایزومراز (*chi*) و قطعه ۷۴۱ جفت باز از ژن پیروات دهیدروژناز کیناز (*pdk*) به عنوان اینترون است که بین ناحیه سنس و آنتی سنس ژن *chi* قرار گرفته است. این سازه در پلاسمید pBI121 کلون شد که حاوی ژن مقاومت به کانامایسین، ژن گزارشگر *gus*، ترمیناتور NOS و پیشبر CaMV 35S است.

Figure 1- Designed RNAi construct for *chi* gene with restriction enzyme in pBI121 vector

chi-RNAi construct containing 530 kb sense and antisense of *chi*'s mRNA and 741 kb of *pdk* as intron that it replaced between sense and antisense of *chi* gene. This construct was cloned in pBI121 plasmid including kanamycin resistant gene, *gus* gene, NOS terminator and CaMV35S promoter.

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی وکتور خاموشی حاوی ژن *chi* استفاده شده جهت آزمون PCR

Table 1- Sequence of specific primers for silencing vector containing *chi* for PCR

Primer name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Synthesized fragment length
sense	CTATCCTTCGCAAGACCC	CAGCATTCGCAGTGCCAGTT	607
antisense	AAACTTCTCAATGGCACGAC	GCGGGACTCTAATCATAAAA	568
vir	GCGGTGAGACAATAGGCG'	GAACTGCTTGCTGTCGGC	2100
kan	ATTCGGCTATGACTGGGCAC	GTAAAGCACGAGGAAGCGGT	676

به منظور ضدعفونی برگ‌ها، ابتدا تمامی نمونه‌ها برای از بین بردن آلودگی‌های سطحی با آب شستشو شدند. سپس با محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه و پس از آن با محلول کاربندازیم ۱ در هزار به مدت ۱۰ دقیقه، تیمار شدند. شستشوی نهایی نمونه‌ها، ۳ مرتبه با استفاده از آب مقطر استریل در زیر هود لامینار انجام شد. برگ‌ها به قطعات کوچک ۰/۵ × ۰/۵ سانتی‌متر برش داده شده و به عنوان ریزنمونه استفاده شدند. ریزنمونه‌های برگی آماده شده به مدت ۱۰ دقیقه با محیط کشت تلقیح تیمار شدند. ریزنمونه‌ها به محیط کشت هم‌کشتی (محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA فاقد آنتی‌بیوتیک و حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) انتقال یافته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اتاق رشد و در تاریکی قرار داده شدند. پس از انجام هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت القای شاخه انتقال داده شدند که شامل نمک‌های محیط کشت MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز،

۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین بود. واکشت ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک بار روی محیط کشت القاء شاخساره حاوی کانامایسین برای گزینش لاین‌های تراریخته و آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم برای از بین بردن اگروباکتریوم انجام شد. گیاهچه‌های تراریخته برای سازگاری به خاک منتقل شدند. محیط کشت گیاهچه شامل پیت ماس و پرلیت (۱:۱) بوده و جهت تامین رطوبت به اندازه کافی آبیاری شد. پس از استقرار و سازگاری کامل گیاهان، خصوصیات مورفولوژیک در گیاهان تراریخته و شاهد مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی وکتور RNAi حاوی ژن *chi* در گیاهان تراریخته

به منظور تایید انتقال سازه خاموشی حاوی ژن *chi* به گیاهان تراریخته، استخراج DNA از برگ‌های گیاهان تراریخته و شاهد با استفاده از کیت ستونی استخراج DNA شرکت دنا زیست آسیا (#S-1030, Iran) انجام شد. واکنش PCR و تایید گیاهان تراریخته با استفاده از دو جفت آغازگر سنتز شده برای وکتور خاموشی حاوی ژن *chi* انجام شد. همچنین برای تایید عدم آلودگی گیاهان تراریخته و شاهد، یک جفت آغازگر ژن *vir* و به منظور تایید ورود وکتور به گیاهان تراریخته، یک جفت آغازگر ژن کانامایسین (*kan*) طراحی و سنتز شد (جدول ۱).

استخراج RNA و سنتز cDNA

در این مرحله، استخراج RNA از گلبرگ‌های گیاهان تراریخته و شاهد با استفاده از کیت ستونی استخراج RNA شرکت دنازیست آسیا (#S-1020, Iran) انجام شد و RNA استخراج شده به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی با DNase I در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد (Thermo Scientific DNase I#EN0525, USA).

آزمون qRT-PCR

در این مرحله از پژوهش، بیان ژن *chi* در گیاهان تراریخته حاوی وکتور خاموشی این ژن و گیاهان شاهد، با استفاده از روش qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت و از ژن *ef1A* به عنوان مرجع استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲- توالی آغازگرهای ژن *chi* و *ef1A* استفاده شده در qRT-PCR گیاه اطلسی

Table 2- *chi* and *ef1A* primer sequences used in petunia qRT-PCR

Primer name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Synthesized fragment length
chi	TCTCCTCCAGTGTCCGTTAC	ACAAACTTCCCTTCTATCTCCAG	137
ef1A	CGGCGTCAACACCTACACC	GAAGTTTCCTGCTGCGATGG	180

تجزیه و تحلیل‌های آماری

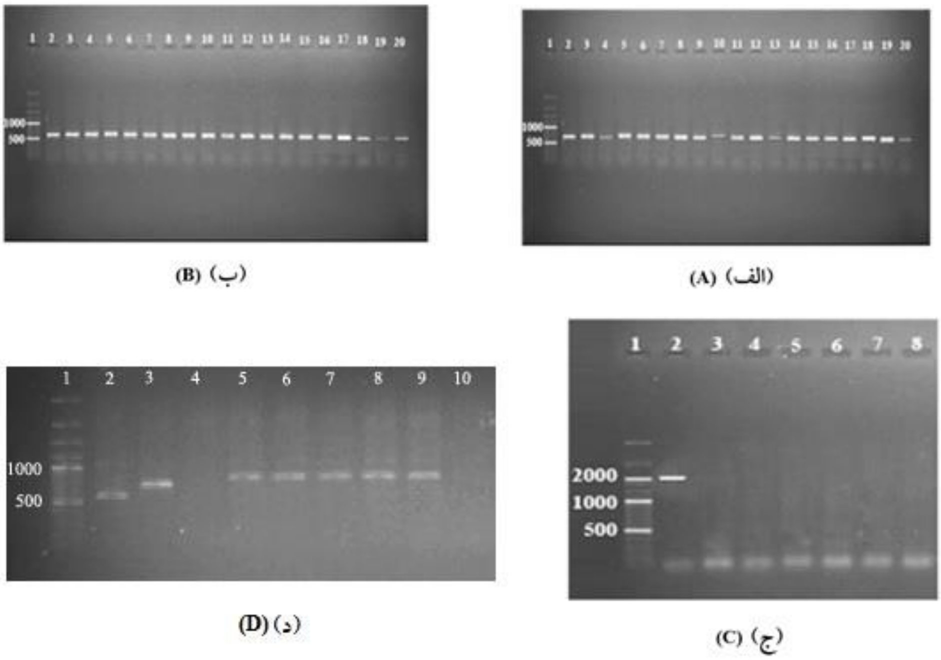
پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS v.16 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه داده‌ها به روش آزمون t در سطح α =٪۹۵ انجام شد و اشکال مربوط به میانگین‌ها و خطوط انحراف معیار مربوط به هر میانگین نیز توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

بررسی درج ترانسژن در لاین‌های تراریخته

گیاهان سازگار شده از نظر درصد تراریختی و تغییرات مورفولوژیکی ارزیابی شدند. از بین ۳۸ لاین مورد بررسی در گل‌های صورتی، ۲۲ لاین، باند ۶۰۷ bp و ۵۶۸ bp مربوط به هر یک از آغازگرهای استفاده شده در واکنش PCR را نشان دادند (راندمان تراریختگی ۵۷/۸۹ درصد)، در حالی‌که در ۱۶ لاین دیگر هیچ باندی مشاهده نشد (شکل ۲ الف و ب). در گیاهان با گل بنفش نیز ۱۰۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت و درصد تراریختی در این گیاهان ۸۴ درصد در نظر گرفته شد (گروه ۱: ۲۰ نمونه از ۲۰ نمونه، گروه ۲: ۱۸ نمونه از ۲۰ نمونه، گروه ۳: ۱۵ نمونه از ۲۰ نمونه، گروه ۴: ۱۸ نمونه از ۲۰ نمونه و گروه ۵: ۱۳ نمونه از ۲۰ نمونه) (شکل ۲ الف و ب). تفاوت در درصد تراریختی هر یک از گل‌های اطلسی با رنگ گل مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت رقم در دریافت باکتری باشد. به عبارت دیگر کارایی انتقال ژن در ارقام مختلف، متفاوت است که در نتیجه منجر به تفاوت در درصد تراریختی در هر یک از گیاهان اطلسی مورد بررسی در این تحقیق شده است. به منظور بررسی عدم آلودگی نمونه‌های تراریخته، آزمون PCR با استفاده از ژن‌های *vir* انجام شد که در هیچیک از نمونه‌های تراریخته و شاهد (غیر تراریخت) باندی مشاهده نشد در حالی‌که در پلاسمید خالص pBI121 حضور این ژن تایید شد (شکل ۲-ج). همچنین به منظور تایید ورود وکتور به گیاهان تراریخت، حضور یا عدم حضور ژن *kan* (ژن مقاوم به آنتی بیوتیک کانامایسین موجود در وکتور pBI121) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این ژن در تمامی گیاهان

تراریخت که سازه خاموشی را دریافت کرده‌اند حضور دارد در صورتی که در گیاهان شاهد (غیر تراریخت) این ژن حضور نداشت (شکل ۲-د). به منظور تایید حضور سازه در وکتور، PCR با آغازگرهای promoter و terminator که توالی آنها در جدول ۱ آورده شده است انجام شد که در وکتورهای نوترکیب، حضور قطعات ۶۰۷ و ۵۶۸ جفت باز مربوط به هر یک از آغازگرها تایید شد در حالی‌که در پلاسمید خالص (غیر نوترکیب) pBI121 باندی مشاهده نشد (شکل ۲-د).



شکل ۲- آنالیز PCR جهت تایید ورود سازه به ژنوم گیاه اطلسی

الف) قطعه ۶۰۷ bp تکثیر شده با آغازگرهای پیشبر و ناحیه سنس ژن *chi*؛ ب) قطعه ۵۶۸ bp تکثیر شده با آغازگرهای ترمیناتور و ناحیه آنتی‌سنس ژن *chi*؛ الف و ب) چاهک ۱: سایز مارکر ۱۰۰ bp؛ چاهک ۲۰-۲: گیاهان تراریخته؛ ج) قطعه ۲ kb ژن *vir*؛ چاهک ۱: سایز مارکر ۱۰۰ bp؛ چاهک ۲: پلاسمید خالص pBI121 (غیر نوترکیب)؛ چاهک ۷-۳: لاین‌های تراریخته اطلسی حاوی سازه RNAi ژن *chi*؛ چاهک ۸: گیاه اطلسی شاهد؛ د) تایید حضور سازه خاموشی در پلاسمید pBI121 نوترکیب و عدم تکثیر در پلاسمید غیرنوترکیب؛ تایید حضور ژن *kan* در گیاهان تراریخته و عدم حضور در گیاه شاهد؛ چاهک ۱: سایز مارکر ۱۰۰ bp؛ چاهک ۲: پلاسمید نوترکیب تکثیر شده با آغازگر antisense؛ چاهک ۳: پلاسمید نوترکیب تکثیر شده با آغازگر sense؛ چاهک ۴: پلاسمید غیر نوترکیب؛ چاهک ۹-۵: گیاهان تراریخته حاوی ژن *kan*؛ چاهک ۱۰: گیاه شاهد.

Figure 2- PCR analysis for conformation of construct introduction to petunia genome

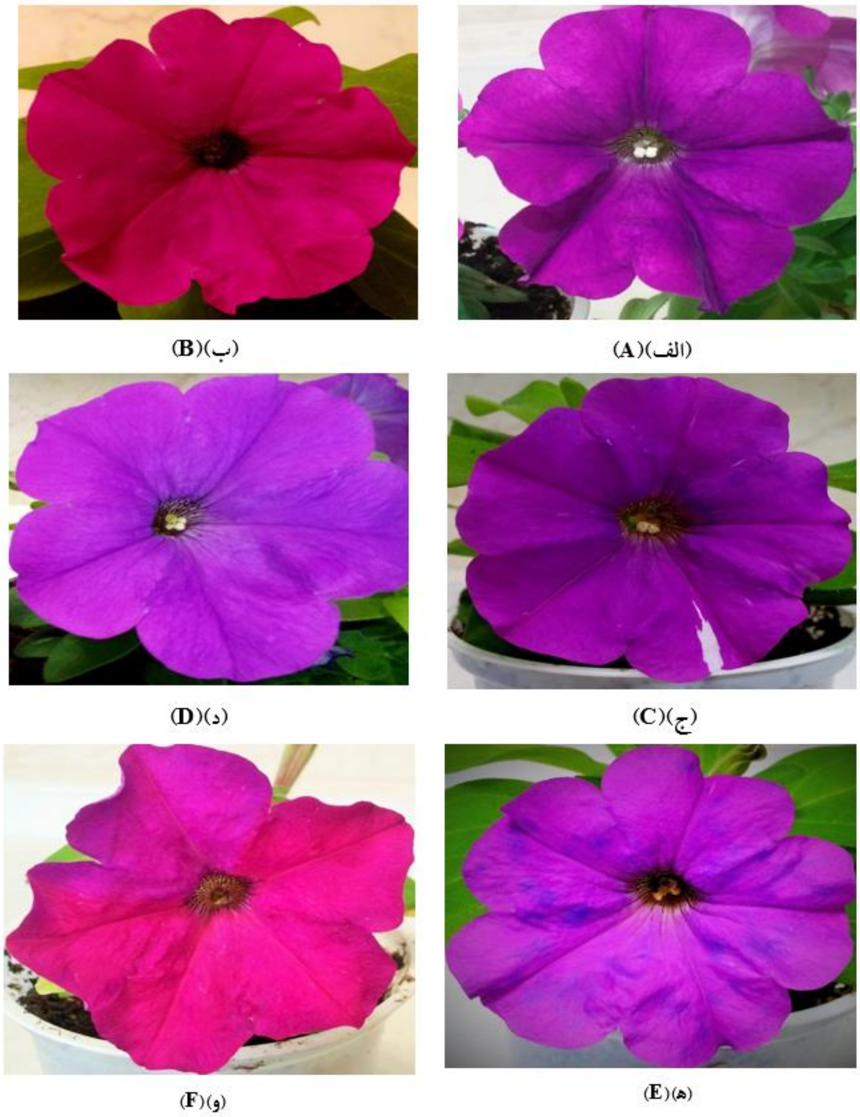
A) Synthesized 607 bp fragment with promoter and sense strand of *chi* primers; B) synthesized 568 bp fragment with terminator and antisense of *chi* primers; A and B) lane 1: 100 bp size marker; lane 2-20: transgenic plants; C) *vir* gene with 2 kb length; lane 1: 100 bp size marker; lane 2: pure pBI121 plasmid (non-recombinant); lane 3-7: petunia transgenic lines containing chi-RNAi construct; lane 8: control plant; D) presence of construct in recombinant pBI121 and its absence in non-recombinant plasmid; presence of *kan* gene in transgenic plants and its absence in control plant; lane 1: 100 bp size marker; lane 2: recombinant plasmid replicated with antisense primers (568 bp); lane 3: recombinant plasmid replicated with sense primers (607 bp); lane 4: non-recombinant plasmid; lane 5-9: transgenic plants containing *kan* gene; lane 10: control plant.

بررسی خصوصیات مورفولوژیک در لاین‌های تراریخته

در گیاهان تراریخته حاصل از گل‌های اطلسی مورد بررسی در این آزمایش، تغییرات متنوعی در رنگ گل مشاهده شد. بطوری‌که بیشترین تغییرات فنوتیپی مشاهده شده و بارز در گیاهان با رنگ گل بنفش بود. در بین نمونه‌های تراریخته در گیاهان بنفش، پنج فنوتیپ رنگ گل به صورت مجزا در نظر گرفته شد و با گیاهان اطلسی بنفش رنگ به عنوان شاهد مقایسه شدند (شکل ۳-الف). فنوتیپ V1، گیاهانی بودند که رنگ گل آن‌ها بطور کامل از بنفش به سرخابی تغییر یافته بود (شکل ۳-ب). در فنوتیپ V2، گل‌ها رنگ بنفش خود را حفظ کرده اما رگه‌های سفید رنگی در گلبرگ‌ها قابل مشاهده بود (شکل ۳-ج). گلبرگ‌های فنوتیپ V3، نسبت به شاهد کاملاً کمرنگ بودند (شکل ۳-د). فنوتیپ V4، گل‌هایی را تشکیل دادند که علاوه بر کمرنگ شدن رنگ گلبرگ‌ها، حالت شیمری یا به عبارتی هیبرید داشتند. به اینصورت که بعضی از نقاط روی گلبرگ‌ها به صورت لکه هایی با شدت رنگ بیشتر مشهود بود (شکل ۳-هـ). تعداد گیاهان با فنوتیپ V5 کم بود و تنها دو گیاه این فنوتیپ را نشان داده و دو

رنگ بودند. به عبارتی نیمی از گلبرگ‌ها بـه رنـگ بـنفش و نیمـی از گلبرگ‌ها سرخابی بودند (شکل ۳-و).

علاوه بر تغییراتی که در رنگ گل گیاهان بنفش اطلسی مشـاهده شد، در بین ۴۰۲ لاین تراریخته، ۱۲۳ گیاه دارای بساک‌هایی با رنگی متفاوت از سایرین بودند. در تمـامی گیاهـان اطلسـی طبیعـی، رنـگ بساک زرد بود. در حالی‌که در ۱۲۳ لاین تراریخته بنفش، رنگ بساک از زرد به بنفش تغییر یافته بود (شکل ۴). این در حالی بود که در سایر گیاهان رنگ بساک زرد بوده و تغییری از نظر رنگ در آن‌ها مشـاهده نشد.

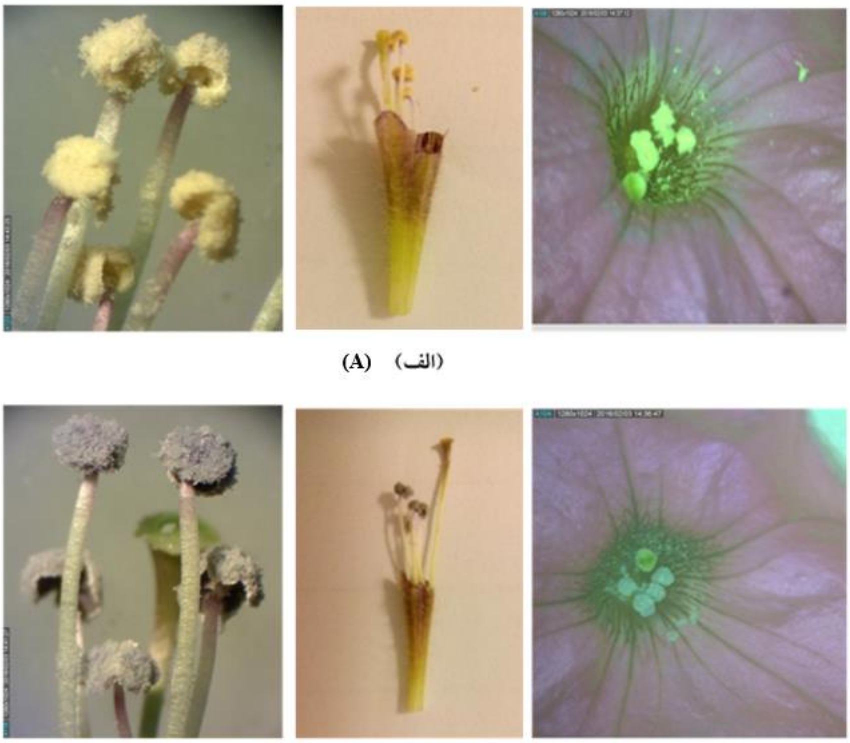


شکل ۳- تغییرات فنوتیپی مشاهده شده در لاین‌های تراریخته اطلسی با رنگ گل بنفش

الف) شاهد؛ ب) فنوتیپ V1: سرخابی؛ ج) فنوتیپ V2: بنفش با رگه‌های سفید؛ د) فنوتیپ V3: بنفش کمرنگ؛ ه) فنوتیپ V4: بنفش شیمر یا هیبرید؛ و) فنوتیپ V5: سرخابی و بنفش (دو رنگ).

Figure 3- Observed phenotypical changes in transgenic petunia with purple flowers

A) wild type; B) V1 phenotype: magenta; C) V2 phenotype: purple with white streaks; D) V3 phenotype: light purple; E) V4 phenotype: chimera or hybrid purple; F) V5 phenotype: magenta and purple (two colors).



(A) (الف)

(B) (ب)

شکل ٤- تغییرات مشاهده شده در رنگ بساک لاین‌های تراریخته بنفش

الف) گل و بساک گیاهان شاهد (حالت طبیعی)؛ ب) تغییر رنگ بساک در گیاهان تراریخته با رنگ گل بنفش.

Figure 4- Observed changes in anther of transgenic purple petunia

A) flower and anther in wild type; B) color change in anther of transgenic purple flowers.



(C) (ج) (B) (ب) (A) (الف)

شکل ۵- تغییرات فنوتیپی مشاهده شده در لاین‌های تراریخته اطلسی با رنگ گل صورتی

الف) شاهد؛ ب) فنوتیپ P1: صورتی کمرنگ؛ ج) فنوتیپ P2: صورتی با رگه‌های سفید.

Figure 5- Observed phenotypical changes in of transgenic pink petunia

A) wild type; B) P1 phenotype: light pink; C) P2 phenotype: pink with white streaks.

در بررسی لاین‌های تراریخته صورتی نیز تنها دو فنوتیپ مشاهده شد. گیاهانی که نسبت به شاهد کمرنگ بودند (P1) (شکل ۵-الف و ب) و گیاهان صورتی که رگه‌های سفید (P2) در آن‌ها مشخص بود و در گروه فنوتیپی دوم طبقه‌بندی شدند (شکل ۵-ج).

تغییرات فنوتیپی مشاهده شده در رنگ گل لاین‌های تراریخته مورد بررسی، نتیجه فعالیت سازه خاموشی ژن *chi* است که سبب خاموشی نسبی مسیر تولید رنگدانه‌های آنتوسیانین شده است که تولید کم رنگدانه‌ها و کمرنگ شدن لاین‌های تراریخته نسبت به شاهد را

بدنبال داشته است. در فنوتیپ‌هایی با رگه‌های سفید رنگ، احتمالاً خاموشی در بخش‌های سفید با فعالیت بیشتری عمل کرده (در این بخش‌ها خاموشی به صورت مطلق روی داده است) و منجر به متوقف شدن کامل مسیر تولید رنگدانه و تجمع نارنجنین چالکون شده است که ماحصل آن تولید رنگدانه‌های سفید و فنوتیپ سفیدرنگ می‌باشد.

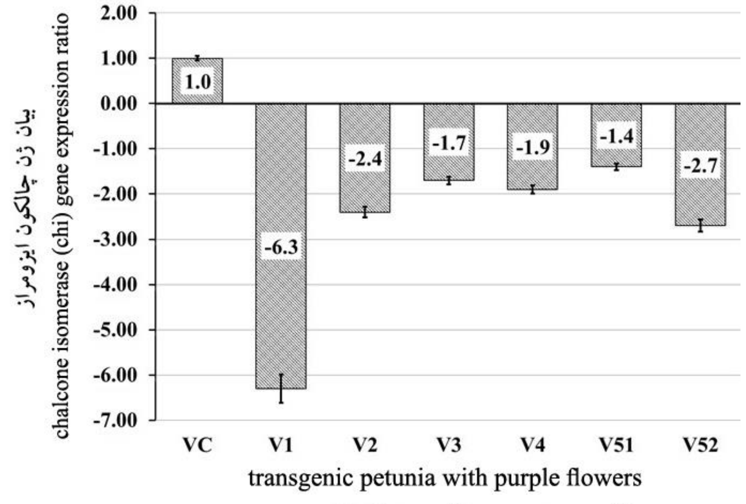
خاموشی ژن‌های چالکون سنتاز و چالکون ایزومراز در گیاهان تورنیا و توتون با استفاده از فناوری RNAi منجر به تولید گیاهانی شد که کاهش شدید رنگ را نشان دادند (Fukusaki *et al*., 2004؛ Nishihara *et al*., 2005). بطوری‌که در گیاهان تراریخته توتون، دو لاین، گل‌هایی به رنگ سفید و ده لاین، گل‌هایی به رنگ صورتی روشن تولید کردند.

در این آزمایش فنوتیپ‌های شیمر یا هیبرید نیز مشاهده شد که احتمالاً نتیجه عمل سازه RNAi در برخی از سلول‌های بافت گلبرگ (فعالیت کمتر ژن *chi* و تولید رنگدانه کمتر) و عدم فعالیت آن در بعضی از سلول‌های دیگر (عدم تغییر رنگ در این بخش از بافت گلبرگ) است که منجر به بروز طیفی از رنگ در بافت گلبرگ این نوع از گیاهان شده است، اما تولید رنگ سرخابی در لاین‌های تراریخته حاصل از گیاهان اطلسی بنفش رنگ، احتمالاً گویای توقف مسیر سنتز ترکیبات دلفینیدین و فعال شدن مسیر تولید ترکیبات سیانیدین در این نوع گیاهان است.

در تحقیقات انجام شده نیز این موضوع گزارش شده است، بطوری‌که در گیاهان تراریخته تورنیا، اطلسی و جنتیانای آبی با کاهش بیان ژن f3´5´h که یک آنزیم کلیدی موثر در تولید ترکیبات دلفینیدین است، تنوعی از رنگ گل (آبی تا صورتی) از طریق تجمع مشتقات سیانیدین مشاهده شد (Tsuda *et al*., 2004؛ Nakamura *et al*., 2006؛ Nakatsuka *et al*., 2008).

آزمون qRT-PCR

در بررسی بیان ژن *chi* در ۵ گروه فنوتیپی لاین‌های تراریخته اطلسی با شاهد، بیشترین کاهش بیان در فنوتیپ سرخابی (V1) مشاهده شد که بیان ژن *chi* در آن ۶ برابر نسبت به شاهد کاهش یافته بود. پس از آن کمترین بیان در لاین‌های تراریخته بنفش با رگه‌های سفید (V2)، بنفش شیمری (V4) و بنفش کمرنگ (V3) مشاهده شد که به ترتیب ۲/۴، ۱/۹ و ۱/۷ برابر نسبت به شاهد کاهش یافته بود. در مورد گروه فنوتیپی پنجم (V5) که دو رنگ بود، استخراج RNA از هر دو بخش بنفش (V51) و سرخابی (V52) انجام شد و آنالیز بیان برای هر بخش در ابتدا نسبت به شاهد و سپس با مقایسه دو بخش با هم صورت گرفت. در مقایسه بین V51 کاهش بیان ژن *chi* به میزان ۱/۴ نسبت به شاهد مشاهده شد اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p \leq 0.05$)، در حالی‌که کاهش بیان بخش سرخابی (V52) نسبت به شاهد ۲/۷ برابر بود. همچنین در مقایسه‌ای که بین دو بخش انجام شد (V51 و V52)، بیان ژن *chi* در بخش سرخابی ۱/۹ برابر نسبت به بخش بنفش رنگ کاهش یافته بود (شکل ۶).



شکل ٦- تغییر بیان ژن *chi* در ۵ گروه فنوتیپی لاین‌های تراریخته اطلسی با رنگ گل بنفش نسبت به شاهد

Figure 6- *chi* gene expression in 5 phenotypical groups of purple transgenic lines rather than wild type

از آنجایی‌که در کل نمونه‌های آزمایشی پژوهش حاضر، بساک های تغییر رنگ یافته فقط در ۱۲۳ لاین تراریخته بنفش رنگ حضور داشتند و در هیچیک از گیاهان شاهد و یا گیاهان تراریخته دیگر، تغییر رنگی در بساک گل مشاهده نشد، بیان ژن *chi* در این گیاهان

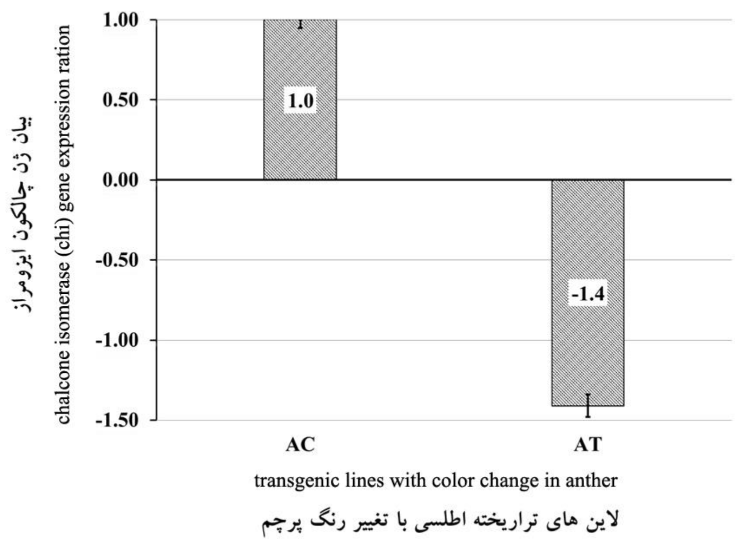
نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور استخراج RNA از بساک گیاهان تراریخته و شاهد (۳ تکرار) انجام شد و پس از ساخت cDNA، بیان ژن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون qRT-PCR نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار ($p \leq 0.05$) ژن *chi* بود، بطوری‌که کاهش ۱/۶ برابری بیان این ژن در بساک گیاهان تراریخته نسبت به بساک گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۷). ژن چالکون ایزومراز در بساک و دانه گرده گل نیز فعالیت دارد. پس کاهش بیان این ژن در بساک گیاهان تراریخته را می‌توان به اثر سازه خاموشی منتقل شده به ژنوم این گیاهان نسبت داد. اما در مورد تغییر رنگ پرچم‌ها به رنگ بنفش، گزارش خاصی وجود ندارد. رنگ بساک در لاین‌های تراریخته گیاه توتون حاوی سازه خاموشی ژن *chi* به زرد تغییر کرده بود (Wang *et al*., 2018؛ Nishihara *et al*., 2005)، انتظار می‌رفت کاهش بیان این ژن در لاین‌های تراریخته اطلسی نیز منجر به افزایش تجمع نارنجنین چالکون و افزایش شدت رنگ زرد در بساک این گیاهان شود. ممکن است تجمع چالکون در بساک این گیاهان نیز اتفاق افتاده باشد، اما عوامل دیگری در عدم بروز رنگ زرد و تولید رنگدانه‌های بنفش در بساک این گیاهان نقش داشته باشد. برای مثال می‌تواند سایر مسیرهای موجود در چرخه فلاونوئیدها در بساک فعال شده باشد یا شرایط بیوفیزیکی محل تجمع رنگدانه‌ها (سیتوپلاسم، سیتوسل و بالاخص واکوئل) از قبیل تغییر در pH و یا فعال شدن عناصر یا یون‌هایی که بر روی تولید و تجمع رنگدانه در این مناطق نقش دارند، منجر به تجمع رنگدانه‌های بنفش در این لاین‌ها شده باشد. حتی ممکن است برهمکنشی از تمامی موارد ذکر شده، علت بروز رنگ بنفش در بساک این گیاهان باشد. هر چند تایید و تعیین دلیل یا دلایل قطعی این مشاهده نیازمند آزمایش‌های تکمیلی می‌باشد.

در گل‌های تراریخته صورتی نیز کاهش ۶ و ۴ برابری بیان ژن چالکون ایزومراز نسبت به شاهد مشاهده شد که به ترتیب مربوط به لاین‌های صورتی کمرنگ (P1) و لاین‌های صورتی دارای رگه‌های سفید (P2) بود (شکل ۸).

در تمامی لاین‌های تراریخته مورد بررسی و فنوتیپ‌های مشاهده شده، کاهش بیان ژن *chi* نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد که نشان‌دهنده کارایی سازه RNAi طراحی شده در خاموشی ژن چالکون ایزومراز (*chi*) می‌باشد که منجر به کاهش بیان ژن و ظهور فنوتیپ های جدید شده است.

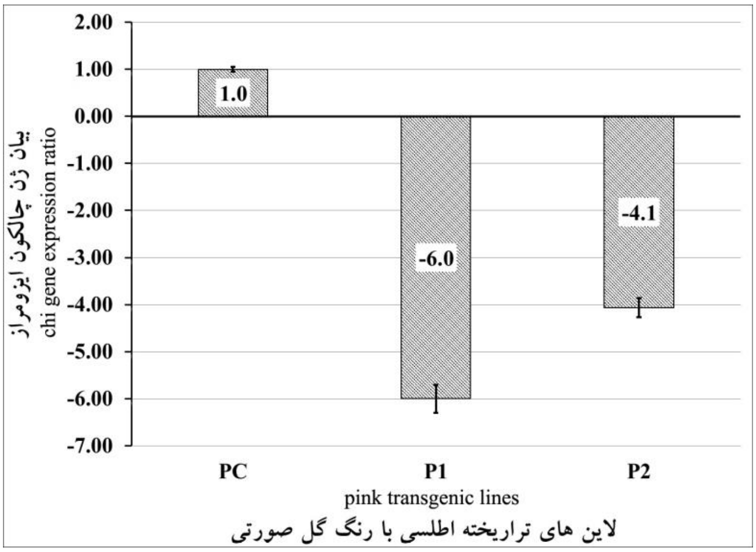
در پژوهش انجام شده، تفاوت در خصوصیات فنوتیپی و میزان بیان ژن *chi* و سایر ژن‌های بررسی شده در لاین‌های تراریخته، نشان‌دهنده تفاوت در درجه خاموشی و کارایی سازه RNAi مورد ارزیابی در اطلسی‌های مورد مطالعه است. بطوری‌که این تفاوت در بین گیاهان تراریخته موجود در یک رنگ نیز بوضوح قابل مشاهده است.

در گیاهان تراریخته توتون حاوی سازه‌های خاموشی مربوط به ژن‌های *f3´h* و *fls* (فلاونول سنتاز) نیز تفاوت در درجه خاموشی در بین گیاهان تراریخته مشاهده شد (Nakatsuka *et al*., 2008؛ Fujino *et al*., 2018). در گیاهان جنتیانای تراریخته با رنگ گل یاسی، تغییر رنگ گل بدلیل تغییر در ترکیب آنتوسیانین‌ها نسبت داده شد، در حالی‌که در گیاهان تراریخته با رنگ گل آبی کمرنگ، کاهش در مقدار آنتوسیانین‌ها، دلیل اصلی تغییر رنگ در گیاهان مورد بررسی در نظر گرفته شده است (Nakatsuka *et al*., 2010).



شکل ۷- تغییر بیان ژن *chi* در لاین‌های تراریخته اطلسی با تغییر رنگ بساک نسبت به گیاهان شاهد

Figure 7- *chi* gene expression in purple transgenic lines with color change in anther rather than wild type



شکل ۸- تغییر بیان ژن *chi* در ۲ گروه فنوتیپی لاین‌های تراریخته اطلسی با رنگ گل صورتی نسبت به شاهد

Figure 8- *chi* gene expression in 2 phenotypical groups of pink transgenic lines rather than wild type

نتایج تحقیقات مختلف نشان‌دهنده کارایی بیشتر خاموشی در ژن‌های بالادست مسیر بیوسنتزی تولید آنتوسیانین‌ها است، بطوری‌که در تحقیقاتی که بر روی گیاه جنتیانا انجام شده است، در گیاهان تراریخته جنتیانا که حاوی سازه RNAi ژن f3´5´h بودند، فراوانی خاموشی نسبت به گیاهان جنتیانای حاوی سازه خاموشی ژن‌های *chs* و *ans* کمتر بود (Nishihara *et al*., 2005). به عبارتی موقعیت ژن مورد نظر در چرخه بیوسنتزی تولید رنگدانه و توالی ژن هدف مورد استفاده در روش RNAi نیز بر کارایی خاموشی موثر است. همچنین طول توالی ژن هدف نیز در فراوانی خاموشی ژن در گیاهان تراریخته تاثیر دارد. بطوری‌که قطعات با طول ۵۰۰–۷۰۰bp بیشترین تاثیر را در خاموشی ژن خواهند داشت، با اینحال، بسته به گونه گیاهی، طول قطعه انتخابی برای خاموشی می‌تواند از ۱۰۰–۱۰۰۰bp متفاوت باشد (Heilersig *et al*., 2006؛ Nakatsuka *et al*., 2010).

روش RNAi بطور گسترده‌ای برای کاهش بیان ژن‌های ساختاری موثر در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها بکار گرفته شده است که سبب ممانعت از تجمع آنتوسیانین‌ها و تغییر رنگ گل در گیاهان تراریخته می‌شود (Nakatsuka *et al*., 2010؛ Chen *et al*., 2017؛ Fujino *et al*., 2018).

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش بطور واضحی نشان داد که ممانعت از فعالیت ژن *chi* می‌تواند در گیاهان اطلسی با استفاده از خاموشی القا شده از طریق RNAi بدست آید و تغییر در مقدار ترکیبات فلاونوئیدی و رنگ در گلبرگ‌های این گیاهان واقع شود. در حقیقت نتایج این آزمایش موید حضور و نقش کلیدی این ژن در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها است که نقش اصلی را در واکنش تبدیل نارنجنین چالکون به فلاوانون ایفا می‌کند.

منابع

1. Ahloowalia, B.S., & Maluszynski, M. (2001). Induced mutations - A new paradigm in plant breeding. *Euphytica 118*, 167–173. https://doi.org/10.1023/A:1004162323428
2. Andersen, Y.M., & Makham, K.R. (2006). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRS Press, Taylor & Francis group, Sound Parkway NW. 1212p. https://doi.org/10.1201/9781420039443
3. Chandler, S.F., & Sanchez, C. (2012). Genetic modification: the development of transgenic ornamental plant varieties. *Wiley Online Library*, *10*, 891–903. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00693.x
4. Chen, G., Liu, H., Wei, Q., Zhao, H., Liu, J., & Yu, Y. (2017). The acyl-activating enzyme PhAAE13 is an alternative enzymatic source of precursors for anthocyanin biosynthesis in petunia flowers. *Journal of Experimental Botany*, *68*, 457–467. https://doi.org/10.1093/jxb/.erw426
5. Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R., & Paredae-Lopez, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains: characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *40*, 173-289. https://doi.org/10.1080/10408690091189257
6. Dixon, R.A. (2005). Engineering of plant natural product pathways. *Current Opinion of Plant Biology*, *8*, 329–336. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.03.008

7. Fujino, N., Tenma, N., Waki, T., Ito, K., Komatsuzaki, Y., & Sugiyama, K. (2018). Physical interactions among flavonoid enzymes in snapdragon and torenia reveal the diversity in the flavonoid metabolon organization of different plant species. *The Plant Journal*, *94*, 372–392. https://doi.org/10.1111/tpj.13864
8. Fukusaki, E., Kawasaki, K., Kajayama, S., An, C., SuZuki, K., Tanaka, Y., & Kobayashi, A. (2004). Flower color modulations of *Torenia hybrida* by down regulation of chalcone synthase gene with RNA interference. *Journal of Biotechnology*, *111*, 229-240. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.02.019
9. Heilersig, H.J.B., Loonen, A.E.H.M., Bergervoet, M., Wolters, A.M.A., & Visser, R.G.F. (2006). Post-transcriptional gene silencing of GBSSI in potato: effects of size and sequence of the inverted repeats. *Plant Molecular Biology*, *60*, 647-662. https://doi.org/10.1007/s11103-005-5280-6
10. Keykha, F., Bagheri, A., & Moshtaghi, N. (2016a). Analysis of chalcone synthase and chalcone isomerase gene expression in pigment production pathway at different flower colors of *Petunia hybrida*. *Journal of Cell and Molecular Research*, *8*, 8–14. https://doi.org/10.22067/jcmr.v8i1.50406
11. Keykha, F., Bagheri, A., Moshtaghi, N., Bahrami, A. R., & Sharifi, A. (2016b). Cellular and Molecular Biology RNAi-induced silencing in floral tissues of *Petunia hybrida* by agroinfiltration: a rapid assay for chalcone isomerase gene function analysis. *Cellular and Molecular Biology*, *62*, 26–31. https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.10.4
12. Kim, D.H., & Rossi, J.J. (2008). RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques*, *44*, 613-616. https://doi.org/10.2144/000112792
13. Lin, J.J. (1995). *Electrotransformation of Agrobacterium, in Methods in Molecular Biology*, 47, Nickoloff, J. A., ed. Humana Press, Totowa, NJ. 171pp. https://doi.org/10.1385/0-89603-310-4:171
14. Nakamura, N., Fukuchi-Mizutani, M., Miyazaki, K., Suzuki, K., & Tanaka, Y. (2006). RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with high frequency and better stability than antisense and sense suppression. *Plant Biotechnology*, *23*, 13-17. https://doi.org/10.5511/PLANTBIOTECHNOLOGY.23.13
15. Nakatsuka, T., Mishiba, K., Abe, Y., Kubota, A., Kakizaki, Y., Yamamura, S., & Nishihara, M. (2008). Flower color modification of gentian plants by RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnology*, *25*, 61-68. https://doi.org/10.1007/s10529-010-0461-z
16. Nakatsuka, T., Mishiba, K. I., Kubota, A., Abe, Y., Yamamura, S., Nakamura, N., Tanaka, Y., & Nishihara, M. (2010). Genetic engineering of novel flower color by suppression of anthocyanin modification genes in gentian. *Journal of Plant Physiology*, *167*, 231-237. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.08.007
17. Nishihara, M., Nakatsuka, T., & Yamamura, S. (2005). Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene. *FEBS Letters*, *579*, 6047-6078. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.073
18. Nishihara, M., & Nakatsuka, T. (2010). Genetic engineering of novel flower colors in floricultural plants: recent advances via transgenic approaches. *Methods in Molecular Biology*, *589*, 325–347. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1_29
19. Nishihara, M., & Nakatsuka, T. (2011). Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Biotechnology Letter*, *33*, 433-441. https://doi.org/10.1007/s10529-010-0461-z
20. Park, E.J & Chen, T.H.H. (2006). Improvement of cold tolerance in horticultural crops. *Haworth Food & Agricultural Products, Singapore* 69–120. https://doi.org/10.1300/J411v17n01_04
21. Potera, C. (2007). Blooming biotech. *Nature Biotechnolgy*, *25*, 963–965. https://doi.org/10.1038/nbt0907-963
22. Tanaka, Y., & Ohmiya, A. (2008). Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*, 190–197. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.015
23. Tanaka, Y., Brugliera, F., & Chandler, S. (2009). Recent progress of flower color modification by biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*, 5350-5369. https://doi.org/10.3390/ijms10125350
24. Thakur, A. (2003). RNA interference revolution. *Electeronic Journal of Biotechnology*, *6*, 39-49. https://doi.org/10.4067/S0717-34582003000100007
25. To, K.Y., & Wang, C.K. (2006). *Molecular breeding of flower color*. Floriculture, Ornamental and Biotechnology Volume. Global Science Books, UK. pp, 300-310.
26. Tsuda, SH., Fukui, Y., Nakamura, N., Katsumoto, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Ohira, K., Ueyama, Y., Ohkawa, H., A.Holton, T., Kusumi, T., & Tanaka, Y. (2004). Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. *Plant Biotechnology*, *21*, 377-386. https://doi.org/10.5511/PLANTBIOTECHNOLOGY.21.377
27. Voorhuijzen, M.M., Prins, T.W., Belter, A., Bendiek, J., Brünen-Nieweler, C., van Dijk, J.P., Goerlich, O., Kok, E.J., Pickel, B., Scholtens, I.M.J., Stolz, A., & Grohmann, L. (2020). Molecular characterization and event-specific real-time PCR detection of two dissimilar groups of genetically modified Petunia (*Petunia x hybrida*) sold on the market. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 11. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01047. eCollection 2020
28. Wang, Y., Xie, X., Ran, X., Chou, S., Jiao, X., Li, E., Zhang, Q., Meng, X., & Li, B. (2018). Comparative analysis of the polyphenols profiles and the antioxidant and cytotoxicity properties of various blue honeysuckle varieties. *Open Chemistry*, *16*, 637–646. https://doi.org/10.1515/chem-2018-0072